

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

INDUÇÃO DE FITOALEXINA GLICEOLINA EM COTILÉDONES
DE SOJA POR FILTRADOS DE *Phytophthora* spp.
ÁREA: FITOPATOLOGIA

Aluno(a): Priscila Juliana Trebien Silva
Orientador: Prof. Dr. Roberto Luis Portz

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das exigências
para a conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA- PR
Dezembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE TECNOLOGIA EM BIOTECNOLOGIA

INDUÇÃO DE FITOALEXINA GLICEOLINA EM COTILÉDONES
DE SOJA POR FILTRADOS DE *Phytophthora* spp.

Aluna: Priscila Juliana Trebien Silva
Supervisor: Prof. Dr. José Renato Stangarlin
Orientador: Prof. Dr. Roberto Luis Portz

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das exigências
para a conclusão do CURSO DE
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
EM BIOTECNOLOGIA.

PALOTINA- PR
Dezembro de 2013.

"Estou sempre alegre. Essa é a melhor maneira de resolver os problemas da vida."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me levantar, ajudar e fortalecer quando pensei que não conseguiria mais.

Aos meus avós, Heltemar F. Trebien e Flora Trebien pelo amor, dedicação, compreensão e pelo sonho de ver uma "filha" sendo "Doutora" na vida, obrigada por acreditar em mim.

A minha mãe Rosimeri Trebien, pelo exemplo de não desistir, mesmo que se leve oito anos para concluir uma graduação, o importante é fazê-la. A amizade, amor e carinho trabalhados desde quando eu era pequena, ainda estão frescos em minha memória e, me tornaram o que sou hoje, obrigada mãe.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina por conceder minha Bolsa Permanência sem a qual eu não teria conseguido concluir este curso.

Ao Prof. Dr. Roberto Luis Portz por me orientar, por acreditar na minha capacidade mesmo eu sendo falha em alguns pontos.

Ao Prof. Dr. José Renato Stangarlin por aceitar me supervisionar e me passar tanto conhecimento.

Agradeço também a Unioeste de M. C. Rondon por me conceder o estágio.

Ao Vander S. Alves por me mostrar o que é determinação, que o difícil é só questão de jeito, e que a minha capacidade é surpreendente. Obrigada por me fazer acreditar em mim mesma.

Aos meus amigos não tenho palavras, apenas sei o quanto são importante para mim, obrigada por não me deixarem desistir, por me fazerem rir nos momentos de profunda tristeza. Gracy Kelly Mazuhovitz obrigada por me mostrar o que é uma amizade, que sorrir é lei e a alegria está nas coisas simples. Maik C. Wiest por me mostrar o que é compaixão, respeito pelas diferenças e que extrapolar as vezes é necessário. A Jaina C. Lunkes e Jussara A. Lunkes obrigada pelas conversas, conselhos, por me fazer sentir especial e libertar sentimentos que a muito tempo estavam oprimidos.

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia: Omari, Vanessa, Emanuele e Sidiane pela ajuda com meus experimentos, mesmo quando tinham o experimento de vocês por fazer. Ao pessoal do Laboratório de Nematologia: Marta, Ingrid e Marlon pela amizade e ensinamentos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estruturas isomérias da gliceolina encontradas durante sua síntese.....	6
FIGURA 2: Corte na superfície adaxial de um cotilédone feito com o auxílio de bisturi para posterior adição dos tratamentos.....	11
FIGURA 3: Meios de cultura apresentando coloração diferenciada após crescimento micelial de <i>Phytophthora</i> spp.....	12
FIGURA 4: Relação das absorbâncias com a coloração apresentada pelo meio de cultivo após vinte e um dias de crescimento micelial de <i>P. citricola</i> , <i>P. infestans</i> e <i>P. sojae</i>	13
FIGURA 5: Placas contendo os cotilédones com os tratamentos com os filtrados puros de (A) <i>P. citricola</i> , (B) <i>P. infestans</i> e (C) <i>P. sojae</i>	13
FIGURA 6: Relação entre absorbância e do extrato obtido de cotilédones de soja tratados com: água destilada/autoclavada; meio cenoura líquido; filtrado de <i>P. citricola</i> puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm; filtrado de <i>P. infestans</i> puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm; e filtrado de <i>P. sojae</i> puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm; e seus respectivos pesos por placa. n= 5 . Teste de Tukey a 5% de significância.....	14

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 SOJA: PRODUÇÃO, MERCADO CONSUMIDOR E PERDAS.....	2
2.2 O GÊNERO <i>PHYTOPHTHORA</i>	3
2.2.1 <i>P. citricola</i> Sawada.....	4
2.2.2 <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) Bary.....	4
2.2.3 <i>Phytophthora sojae</i> Kaufm & Gerd.....	5
2.3 FITOALEXINAS.....	5
2.4 CONTROLE ALTERNATIVO.....	7
3 OBJETIVO GERAL.....	8
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO.....	9
4.2 OBTENÇÃO DOS FILTRADOS.....	9
4.3 TRATAMENTOS.....	10
4.4 OBTENÇÃO DOS COTILÉDONES DE SOJA (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	10
4.5 INDUÇÃO DE FITOALEXINAS.....	10
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5.1 AVALIAÇÃO DOS FILTRADOS.....	12
5.2 AVALIAÇÃO DOS COTILÉDONES INOCULADOS COM FILTRADO DE <i>PHYTOPHTHORA</i> SPP.....	13
6 CONCLUSÃO.....	16
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

1 INTRODUÇÃO

Os desafios para a produção da soja se iniciam antes mesmo da semente ser semeada. A escolha de uma cultivar resistente a patógenos ou adaptada a determinadas condições climáticas, deve ser levada em consideração para se obter uma produção satisfatória. Ataques na lavoura são freqüentes e se iniciam antes mesmo da semente germinar. Microrganismos, insetos e plantas daninhas atacam as áreas de plantio durante todo o ciclo desta cultivar, reduzindo a produção ou causando perdas de até 100% da lavoura (EMBRAPA, 2008).

Phytophthora sojae (Oomyceto), vem preocupando os produtores do mundo todo, considerada a segunda doença que mais causa perdas nos EUA, prejudicou grandemente as safras do Rio Grande do Sul e Paraná (COSTAMILLAN et al., 2012).

Para a proteção das cultivares uma grande quantidade de agroquímicos é utilizada anualmente, mas existem outras formas de controle alternativo de pragas e patógenos, como o controle biológico e a indução de resistência. Estas alternativas não utilizam produtos químicos, e visam induzir a própria planta a produzir respostas de defesa contra ataques de patógenos, dentre estas respostas está a produção de fitoalexinas (GOMES et al., 2009; CAMATTI-SARTORI et al., 2011).

As fitoalexinas são moléculas de composição química variada que, através de moléculas eliciadoras (indutoras de resposta), são produzidas para a defesa da planta. Mais de 300 fitoalexinas já foram descritas, dentre elas a gliceolina, fitoalexina encontrada na soja que causa inibição da ativação de enzimas fúngicas, granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares e ruptura da membrana plasmática (GOUVEA et al., 2011).

Levando em consideração uma demanda crescente de alimentos, faz-se necessário uma maior atenção a formas de reduzir danos ocasionados por doenças de plantas. Neste sentido, a utilização de moléculas eliciadoras em plantas cultivadas pode trazer grandes benefícios para a produção, além de mitigar possíveis impactos ao homem e ambiente. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a indução da gliceolina em cotilédones de soja utilizando filtrado concentrado e diluído de *Phytophthora* spp., visto o potencial destes na indução desta fitoalexina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SOJA: PRODUÇÃO, MERCADO CONSUMIDOR E PERDAS

Atualmente, no que se diz respeito a culturas amplamente utilizadas tanto na agroindústria, quanto na indústria química e de alimentos, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas mais importantes para a economia mundial, com uma demanda crescente a cada safra (FREITAS, 2011). No Brasil, estima-se para a safra 2013/2014 um aumento considerável entre 7,5 a 10,1%, apresentando uma produção recorde com uma variação de 87.602,8 a 89.720,5 milhões de toneladas a serem produzidas (CONAB, 2013).

A soja foi uma das culturas que apresentaram crescimento mais expressivo, tanto no cultivo quanto no segmento agroindustrial na segunda metade do século XX no Brasil, o que justifica sua importância econômica para o país, tornando-se responsável por aproximadamente 40% da produção nacional de grãos (BARBOSA & ASSUMPÇÃO, 2001; MOREIRA et al., 2012).

Apesar de esta cultura estar presente em todas as regiões do país, os estados do Mato Grosso e do Paraná são responsáveis por 47% da produção nacional deste grão. No Paraná, a região Norte do estado é responsável por 27% da produção, seguida do Sul com 25%, e da região Oeste com 21%. Em termos de produção mundial, somente o Mato Grosso corresponde a 8% do montante, ficando em primeiro lugar em relação a área plantada, seguido do Paraná com o Rio Grande do Sul ocupando a terceira posição (ICONE, 2011; SEAB/DERAL, 2012).

Em 1980 a demanda crescente por este grão impulsionou o avanço tecnológico empregado para a criação dos transgênicos, ou dos organismos geneticamente modificados (OGM) que possuem material genético exótico ao da planta introduzido ao seu genoma, tornando possível que a mesma produza ou tolere outras substâncias antes nocivas. Também oferecem uma maior produção com gastos reduzidos durante o crescimento da lavoura, com variedades resistentes ao déficit hídrico, ataque de pragas, a herbicidas, entre outros. Durante a safra de 2010/2011 praticamente 80% de toda a produção brasileira era composta de soja transgênica (CARVALHO et al., 2012).

Analisando os custos de produção para safra 2013/2014 a soja convencional apresenta um custo inferior de R\$ 88,57 quando comparada a soja transgênica. Além de custos inferiores, o mercado internacional o qual importa cerca de 2/3 da soja brasileira possui preferência pela soja convencional. O antagonismo em relação aos OGMs começou devido a

questionamentos em relação a segurança desses alimentos e a problemas ocorridos tanto na Europa quanto na Ásia (SILVEIRA & RESENDE, 2010; EMBRAPA, 2013).

As perdas na lavoura são constantes, e se iniciam antes mesmo da semente germinar. Microrganismos e insetos podem danificar tanto as sementes quanto as plântulas emergentes. Cerca de 40 doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e nematóides já foram descobertas no Brasil, causando perdas na produção anual de até 20%, em casos severos de até 100% (EMBRAPA, 2008).

Dentre as principais doenças relacionadas à soja destacam-se a antracnose causada por *Colletotrichum truncatum*, cancro da haste por *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, podridão branca da haste por *Sclerotinia sclerotiorum*, podridão vermelha da raiz *Fusarium* spp., a ferrugem americana por *Phakopsora meibomia* e a ferrugem asiática por *Phakopsora pachyrhiz*. Uma nova doença que vem se tornando cada vez mais freqüente é a podridão radicular, causada pelo oomiceto *P. sojae*, que ataca tanto as sementes quanto as plantas em qualquer estágio de desenvolvimento (COSTAMILAN et al., 2007 ; EMBRAPA, 2008).

2.2 O GÊNERO *PHYTOPHTHORA*

O gênero *Phytophthora* (*phyton* = planta, *phthora* = destruidor) é estudado desde o início da fitopatologia. Pertence ao Reino *Straminipila*, Filo *Oomycota*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, estando entre os principais fitopatógenos de diversos cultivos economicamente importantes ou não, afetando todos ou somente alguns órgãos específicos de seu hospedeiro. Atualmente, este gênero engloba mais de 103 espécies, e este número vem aumentando devido ao monitoramento intensivo de viveiros e florestas (SANTOS, 2010; SYKORA et al., 2012).

Possuem algumas características semelhantes aos fungos como, possuírem crescimento filamentosos, serem microrganismos heterotróficos, ausência de pigmentos fotossintéticos e se reproduzirem por esporos, são classificados como pseudofungos (Oomycetos), por possuírem parede celular composta por celulose no lugar de quitina, com esporos biflagelados, sendo um deles com presença de pêlos, micélio diplóide na maior parte de seu ciclo de vida, entre outras características (SANTOS, 2010).

O micélio de *Phytophthora* é hialino e cenocítico, sendo que em cultivos em meios de cultura diferentes pode haver variações de suas colônias. Seus esporos assexuais (zoósporos) flagelados desenvolvem-se com mais freqüência nas estações quentes e chuvosas do ano

assim como a germinação das estruturas de resistência que são os clamidósporos e oósporos (esporos sexuais). Quando liberados no solo os zoósporos nadam até as raízes atraídas por substâncias produzidas por ferimentos, ao se depositarem no tecido vegetal germinam e começam a produzir hifas que invadem as células vegetais. Como sintomas, as plantas podem apresentar falta de vigor, tombamento, clorose de folhas, exsudação de gomose, podridão das raízes, de colo, de tronco, dos frutos além de infectar sementes antes mesmo de sua germinação (SORIANO, 2011).

O Brasil vem sofrendo perdas anuais causadas por este patógeno na agricultura, que é responsável pela murchadeira em plantas de pimentão, berinjela e tomate (*P. capsici*); podridão parda de frutos do cacaueiro e mamoeiro, assim como a podridão medular da pupunheira (*P. palmivora*); gomose na acácia-negra (*P. nicotianae* e *P. boehmeriae*); podridão radicular da soja (*P. sojae*); requeima da batata (*P. infestans*); doença da tinta do castanheiro (*P. cinnamoni* Rands); perda na produção de citrus (*P. citrophthora*), entre outras. (ROSA et al., 2003; FALEIRO et al., 2004; SANTOS & LUZ, 2006; LOPES, 2007; MEDEIROS et al., 2008; TOCAFUNDO, 2008; SILVA et al., 2008; MAFACIOLI et al., 2009).

2.2.1 *Phytophthora citricola* Sawada

P. citricola é um importante patógeno do solo, causando doenças em diversos grupos de plantas em todo o mundo. Sua primeira descrição data 1916, causando cancro nos troncos de abacate na Califórnia. Em 1927 foi observada em citrus, causando mancha foliar e apodrecimento de tecidos acima do solo. No Brasil, pomares de laranjeiras situadas no estado de Alagoas são afetadas por este patógeno, causando exsudação de gomose, apodrecimento do tecido vegetal e podridão parda dos frutos. Apesar de ser descrita atacando várias plantas de famílias diferentes, este patógeno ainda não foi observado em soja (MUNIZ et al., 2004; HONG et al., 2009; MRÁZKOVÁ et al., 2011;).

2.2.2 *Phytophthora infestans* (Mont.) Bary

O patógeno *P. infestans* é o mais notório e devastador da história humanidade, sendo responsável pela Grande Fome Irlandesa de 1840 onde dizimou as plantações de batata, na época principal fonte de alimentação da população irlandesa. Atualmente, ainda causa severos danos para as culturas de tomate e batata (NELSON, 2008).

Na região sul do Brasil, a produção de batatas ainda é potencialmente afetada por este patógeno. A região centro-oeste brasileira maior produtora de tomate (65% da produção brasileira), gasta uma parcela expressiva do custo de produção dessa cultura no controle de *P. infestans*. Este gênero é descrito atacando membros principalmente da família das solanáceas, não havendo registros de seu ataque a soja (NAZARENO et al., 2004; REIS et al., 2006).

2.2.3 *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd

Apesar de ainda ser uma espécie pouco descrita e conhecida, *P. sojae* já é considerada a segunda doença mais prejudicial para a produção de soja nos EUA. Causando a podridão de raízes e hastes da planta de soja, causa perdas consideráveis na produção desta leguminosa, podendo chegar a 100%. Na América do Sul, foi descrita primeiramente na Argentina em 1970, chegando ao Brasil em 1995 causando grandes perdas na produção do Rio Grande do Sul e Paraná (COSTAMILAN et al., 2012).

2.3 FITOALEXINAS

As plantas possuem um arsenal bem complexo de substâncias para proteção, acionadas assim que reconhecem uma agressão, causam alterações no metabolismo da célula vegetal sintetizando proteínas de defesa, dentre estas substâncias se encontram as fitoalexinas. As fitoalexinas (*phyton* = planta; *alexin* = composto de defesa) são um grupo de metabólitos secundários de baixo peso molecular e possuem ação antimicrobiana, com estrutura química variada podendo ser tanto flavonóides, quanto cumarinas, diterpenos, luteolinidina, apigenidina e apigeninidina (MAZARO, 2008; ZORZETE, 2010).

Atualmente, cerca de 300 fitoalexinas já foram descritas, sendo a pisatina encontrada em plantas de ervilha (*Pisum sativum*) a primeira a ser caracterizada quimicamente, dando o pontapé inicial para a descoberta dessa substância em outras culturas. Como as fitoalexinas abrangem uma grande classe de compostos e cada família botânica responde de uma maneira diferente, são identificadas pelo seu grande acúmulo nas células vegetais após estas serem infectadas e terem ação inibidora do crescimento de microrganismos, limitando seu crescimento no interior da planta (YAMADA, 2004; MAZARO, 2008).

Segundo Rizzard et al. (2003), as fitoalexinas são sintetizadas em diferentes vias metabólicas que atuam conjuntamente, como a rota do acetato-mevalonato e a rota do ácido

shiquímico, rota do acetato-malonato e a rota do ácido shiquímico e, também, as três vias atuando conjuntamente. Portanto, a característica comum da síntese das fitoalexinas é a presença da rota do ácido shiquímico.

Para que a planta possa produzir uma resposta de defesa e haja a produção destes metabólitos secundários ela precisa ser induzida. Os estresses físico, químico e biológico são capazes de produzir esta resposta, atuando como indutores de resistência, ou seja, elicitores. Estes se ligam a receptores específicos na membrana celular vegetal, desencadeando mudanças metabólicas em seu interior, como a produção das fitoalexinas (STANGARLIN et al., 2010; GOUVEA et al., 2011).

A soja (*Glycine max*) tem como fitoalexina a gliceolina, sendo um pterocarpanóide (flavonóide), molécula importante para a defesa desta leguminosa contra fitopatógenos, causando a inibição da ativação de enzimas fúngicas, granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares e ruptura da membrana plasmática (GOUVEA et al., 2011). Sua síntese se inicia em parte na via dos fenilpropanóides que, durante a infecção da planta hidrolisam isoflavonas pré-formadas (malonilglucosil-daidezina e malonilglucosil-genisteína) liberando a daidezina (molécula precursora da gliceolina) e genisteína (molécula inibidora de crescimento). Durante a produção desta fitoalexina, é possível obter a formação de quatro estruturas isômeras da gliceolina (Figura 1), que possuem a mesma função (SIMÕES, 2004).

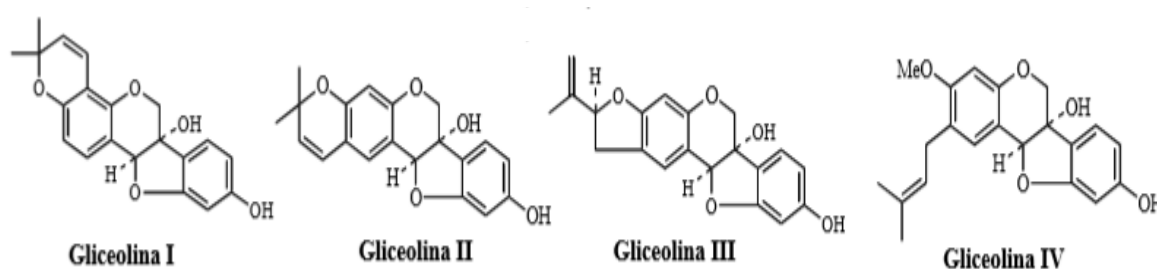


FIGURA 1: Estruturas isoméricas da gliceolina encontradas durante sua síntese. Fonte: SIMÕES, 2004.

A ação desta fitoalexina pode ser inibida ou ter seu potencial diminuído com o uso do agroquímico glyphosate que impede a via do ácido shiquímico, precursora para a produção da gliceolina, deixando a planta propensa a ataques e doenças (ALBRECHT & ÁVILA, 2010). Este fato evidencia a necessidade de utilização de outros métodos de proteção da lavoura, que não interfiram na produção de resposta de resistência da própria planta.

2.4 CONTROLE ALTERNATIVO

Com uma demanda crescente por alimentos a produção mundial bate recorde anualmente, maximizando sua produtividade com o uso de agroquímicos em quantidade elevada. A utilização destes químicos proporciona resultados rápidos e efetivos na lavoura, em contrapartida causam danos ao meio ambiente como contaminação do solo, da água, e dos próprios alimentos, oferece riscos a saúde humana, além de induzir o surgimento de plantas, insetos e microrganismos resistentes a estes tratamentos químicos (GOMES et al., 2009; CAMATTI-SARTORI et al., 2011).

O controle alternativo não faz uso de defensivos agrícolas, mas pode ser utilizado juntamente com outros tratamentos (rotação de culturas, podas, entre outros), aumentando a produção e protegendo a lavoura tanto de pragas e patógenos, quanto de plantas daninhas. Outro ponto positivo a esta prática é a não contaminação do meio ambiente, nem dos alimentos produzidos e nem oferece riscos a saúde de quem aplica o tratamento (MORAES, 1992).

Existem alternativas para o controle e amenização das perdas nas lavouras produzidas por pragas e patógenos, o controle biológico e a indução de resistência são os principais exemplos de controle alternativo.

O controle biológico visa controlar microrganismos patogênicos com microrganismos antagônicos, que agem na planta por meio de hipovirulência, parasitismo, competição, predação ou antibiose, inibindo ou impedindo o crescimento do patógeno através da produção de metabólitos (antibióticos). Pesquisas mostram que os microrganismos antagônicos são capazes de ativar respostas de defesa do seu hospedeiro, como a resistência sistêmica induzida, prevenindo o estabelecimento de doenças, conseqüentemente sua morte (BERNARDES, 2006).

A indução de resistência envolve a ativação de vários genes e mecanismos latentes existentes na planta. Sendo realizada por agentes bióticos, abióticos ou físicos (agentes eliciadores), que promovem resposta de resistência na planta, como a produção de lignina fortalecendo as barreiras estruturais, síntese de fitoalexinas que são capazes de neutralizar ou incapacitar o microrganismo patogênico, acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (enzimas hidrolíticas), reações de hipersensibilidade, entre outras (RODRIGUES et al., 2006; TAVARES et al., 2009; STANGARLIN et al., 2010).

Para que haja a produção de uma resposta necessita-se primeiramente fazer reconhecimento, este consiste em uma molécula eliciadora produzida pelo fitopatógeno que,

liga-se a um receptor presente na membrana plasmática da célula vegetal. Após esta ligação ocorre a sinalização e a síntese de compostos de defesa. Ainda não se sabe como ocorre esta ligação entre receptor e elicitor, mas sabe-se que um elicitor pode ligar-se a mais de um receptor (SILVA et al., 2004).

Vários trabalhos realizados mostram a eficácia do uso de extrato de plantas medicinais para a indução de resistência, dentre eles extratos de alho, cravo-da-índia, canela, arruda, cavalinha, hortelã, nim, dentre outros (VENTUROSIO et al., 2011). Entretanto, metabólitos produzidos em meio de cultura ou extraídos de micélio fúngico ou células bacterianas possuem a mesma ação de indução se comparado ao próprio microrganismo que o produziu (MORAES, 1992).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de fitoalexina em cotilédones de soja tratados com filtrados de *Phytophthora* spp.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja tratados com diferentes concentrações de filtrados de *P. citricola*, *P. infestans* e *p. sojae*.
- Comparar a produção de gliceolina entre os diferentes tratamentos utilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO

As atividades relacionadas ao estágio supervisionado obrigatório ocorreram nas dependências da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon. O período das atividades relativas ao estágio foi de três meses (26 de agosto a 02 de novembro de 2013), realizando-se 40 horas semanais, totalizando 360 horas de estágio obrigatório. As atividades foram desenvolvidas nos Laboratórios de Fitopatologia e Nematologia da Unioeste, sob a supervisão Prof. Dr. José Renato Stangarlin.

4.2. OBTENÇÃO DOS FILTRADOS DE *Phytophthora* spp.

Para a realização dos testes, placas contendo *P. citricola* foram cedidas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), e as placas contendo *P. infestans* e *P. sojae* pela Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para obtenção de filtrados o patógeno foi cultivado inicialmente em placas de Petri, contendo meio cenoura (200g de cenoura, 15g de ágar para 1000 mL de água destilada) autoclavado (ABDANUR et al., 2003) e mantidos em BOD a 25° C por 7 dias para crescimento e manutenção dos isolados. Após este período de crescimento, discos contendo *Phytophthora* spp. foram colocados em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de meio cenoura líquido autoclavado por 15 minutos a 120 atm, acondicionados em um Shaker a 160 rpm, 26°C, durante 21 dias, para a obtenção de metabólitos extracelulares do patógeno.

Posterior ao período de agitação, o meio foi filtrado com o auxílio de uma bomba a vácuo (compressor/aspirador modelo Fanem- DIAPUMB), kitassato, filtro de Buchner e papel filtro. O filtrado foi acondicionado em tubos Falcon de 50 mL e congelado, para posterior utilização. Como controle, erlenmeyers contendo somente meio cenoura líquido foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e agitação que os demais.

Com o objetivo de avaliar indiretamente a produção de possíveis enzimas hidrolíticas, foram medidas as absorbâncias nos filtrados obtidos, utilizando como parâmetro de referência a mudança de coloração do meio. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 590 nm, comprimento de onda correspondente a faixa de luz laranja, obtendo-se as respectivas absorbâncias.

4.3 TRATAMENTOS

Para a indução de fitoalexina nos cotilédones, 17 tratamentos foram utilizados. Sendo eles: água destilada/autoclavada; meio cenoura líquido; filtrado de *P. citricola* puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm; filtrado de *P. infestans* puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm; e filtrado de *P. sojae* puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 ppm. A obtenção dessas concentrações consistiu-se em diluir 5, 10, 20 e 40 µL em 100 mL de água destilada/autoclavada.

4.4 OBTENÇÃO DOS COTILÉDONES DE SOJA (*Glycine max* (L) Merrill)

As sementes de soja utilizadas neste trabalho foram do cultivar convencional Nk 412113. Para sua utilização as sementes foram desinfetadas, ficando imersas em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em hipoclorito de sódio 3:1 (3 partes de água: 1 parte de hipoclorito) por 2 minutos, finalizando com diversas lavagens em água destilada.

Para posterior cultivo, areia foi autoclavada em autoclave a 120 atm por 1 hora, para total assepsia da mesma. Disposta em bandejas de plástico onde, com o auxílio de uma caneta foram feitos buracos em sequência, para a colocação das sementes que, após serem semeadas foram cobertas com areia. As bandejas permaneceram no Laboratório de Fitopatologia, em temperatura ambiente (25° C), sendo regadas com água destilada.

4.5 INDUÇÃO DE FITOALEXINA

Após o período de 12 dias, os cotilédones foram destacados e dispostos em placas de Petri (cinco cotilédones/placa), contendo um disco de papel Germitest umedecido com 2 mL de água destilada/autoclavada. Com o auxílio de um bisturi, foi realizado um corte na superfície adaxial de cada cotilédone (Figura 2), onde se adicionou 20µL das soluções de cada tratamento, totalizando 425 cotilédones utilizados. Com o auxílio de papel alumínio as placas foram totalmente cobertas, incubadas em BOD a 25° C por 20 horas. Após este período, os cotilédones foram pesados (peso/placa) e transferidos para frascos contendo 10 mL de água destilada/autoclavada, agitados em seguida por 1 hora em um Shaker (160 rpm) para a extração da fitoalexina. Após a retirada dos cotilédones, foi realizada a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a uma absorbância de 285 nm (STANGARLIN et al.,

2010), utilizando como branco a água destilada/autoclavada e como testemunha negativa o meio cenoura líquido. Posterior a leitura, as absorbâncias obtidas foram divididas pelo peso/placa e analisadas com o software Sisvar, teste de Tukey a 5% de significância.



FIGURA 2: Corte na superfície adaxial de um cotilédone feito com o auxílio de bisturi para posterior adição dos tratamentos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DOS FILTRADOS

No decorrer do experimento, durante a agitação dos meios de cultura contendo micélios em crescimento, observou-se sutil mudança de coloração dos mesmos (Figura 3), passando do laranja para quase translúcido em alguns dos meios.



FIGURA 3: Meios de cultura apresentando coloração diferenciada após crescimento micelial de *Phytophthora* spp.

Essa condição está relacionada ao crescimento micelial de *Phytophthora* spp. no meio. As espécies de *Phytophthora* secretaram enzimas hidrolíticas no meio de cultura, com objetivo de prover nutrientes de um ambiente restrito para seu metabolismo continuar funcionando. Estas enzimas também podem estar envolvidas ao fator de patogenicidade. A mudança de coloração do meio de cultivo para cada espécie se dá pela necessidade nutricional de cada uma, secretando mais ou menos enzimas (BRAZ, et al., 2009).

As análises dos filtrados em espectrofotômetro em absorbância de 590 nm, evidenciou que o filtrado de meio cenoura ainda apresentava uma grande quantidade de compostos não hidrolizados, deixando-o com coloração mais escura, já os meios com crescimento micelial de *P. citricola*, *P. infestans* e *P. sojae* apresentaram um filtrado quase translúcido, principalmente *P. infestans* (Figura 4).

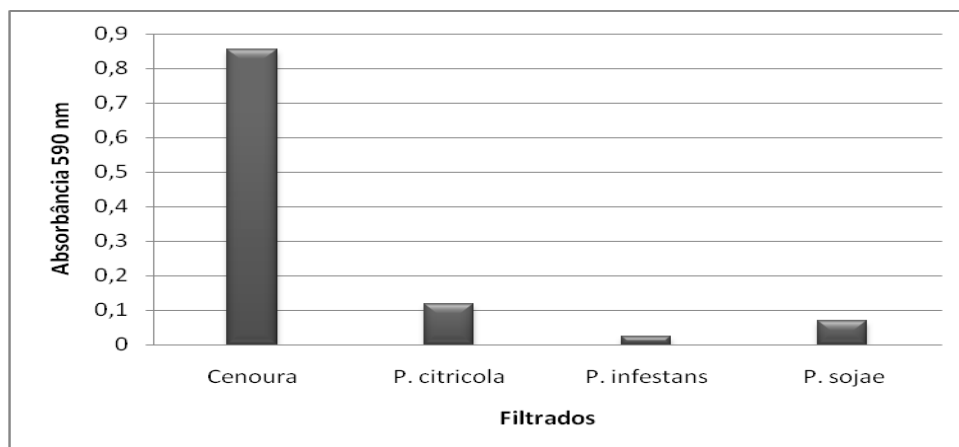


FIGURA 4: Relação das absorbâncias com a coloração apresentada pelo meio de cultivo após vinte e um dias de crescimento micelial de *P. citricola*, *P. infestans* e *P. sojae*.

5.2 AVALIAÇÃO DOS COTILÉDONES INOCULADOS COM FILTRADO DE *PHYTOPHTHORA* SPP.

Ao término do período de 20 horas em BOD sem fotoperíodo, foi possível observar certa mudança de coloração na área dos cotilédones que receberam os tratamentos, passando do verde para o laranja avermelhado, apresentando coloração mais dominante nas placas contendo *P. sojae* e *P. citricola* com filtrado puro (Figura 5).

Esta mudança de coloração se deve à presença de pterocarpanos precursores das gliceolinas, como o glicinol que acumulou-se em maior quantidade sob os cotilédones que mostraram maior resposta a indução (SIMÕES, 2004).

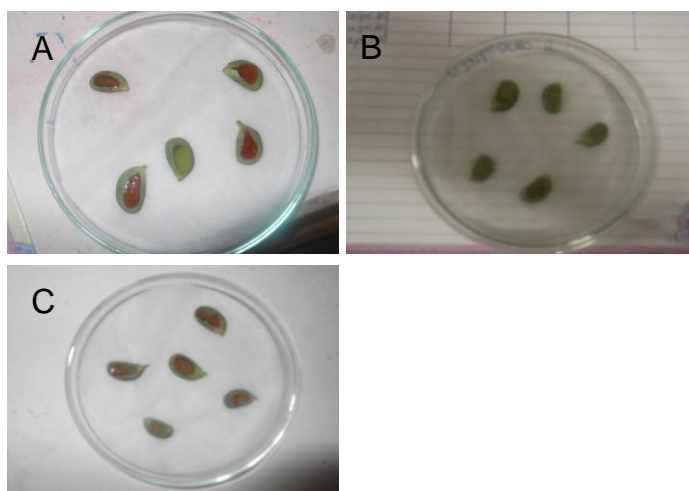


FIGURA 5: Placas contendo os cotilédones de soja tratados com os filtrados puros de (A) *P. citricola*, (B) *P. infestans* e (C) *P. sojae*.

Em seguida na leitura das absorvâncias, observou-se que a maior parte dos cotilédones tratados com filtrado concentrado de *P. citricola* e *P. sojae* apresentaram produção significativa de gliceolina (Figura 6).

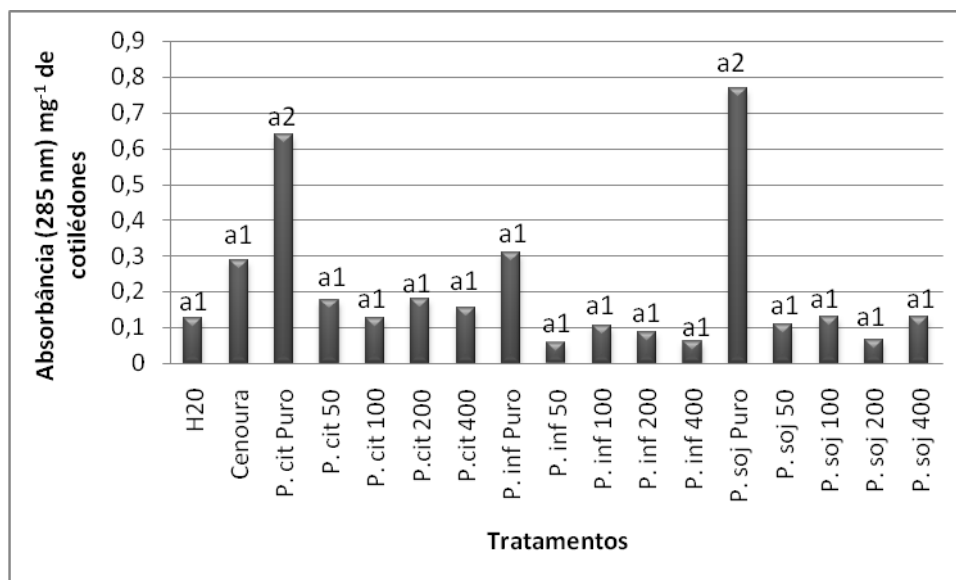


FIGURA 6: Relação da absorvância do extrato obtido dos cotilédones de soja tratados com: água destilada/autoclavada; meio cenoura líquido; filtrado de *P. citricola* puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 p.p.m.; filtrado de *P. infestans* puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 p.p.m.; e filtrado de *P. sojae* puro e nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 p.p.m; divididos por seus respectivos pesos por placa. n= 5 . Teste de Tukey a 5% de significância.

Na literatura, não há relatos de que a cultivar Nk 412113 seja suscetível a *Phytophthora* spp., mas é resistente a ataques de míldio (*Peronospora manchurica*), portanto, subentende-se que esta cultivar possui certa resistência contra o ataque de oomycetos (ALLIPRANDINI, KUREK, KRENSKI, 2003).

Segundo Terce-Laforgue, Huet e Pemollet (1992), numerosos elicitores de necrose produzidas por fungos durante a interação fungo-planta têm sido descritos e são considerados como sendo responsáveis pela indução da reação de hipersensibilidade. Eles servem como sinais para a interação entre plantas e patógenos.

Os mesmo autores realizaram testes com *P. cryptogea* em plantas de tabaco, descobrindo-se que este patógeno secreta no meio de cultura uma haloproteína denominada critptogéia que possui função elicitora, promovendo o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese e induz a proteção contra uma inoculação subsequente do patógeno. *P. capsici* em mesmas condições de teste secretou a capsaiceína em meio de cultura, já a *P. nicotianae* não produziu nenhuma proteína quando testada.

No patossistema batata/*Phytophthora infestans*, glucanos ramificados de baixo peso molecular, são responsáveis pela supressão do acúmulo de fitoalexinas sesquiterpenoídicas. Como a estrutura desses glucanos não é muito diferente daqueles descritos como eliciadores, sugere-se que sua ação poderia ser por competição com os eliciadores pelo sítio receptor nas células vegetais (SMITH, 1996). Considerando estes dados, é possível que *P. infestans* não tenha apresentado resultado devido a esta competição pelo sítio de ligação das moléculas elicitoras, impedindo sua ligação com a célula, interferindo na produção da gliceolina.

Já os metabólitos extracelulares de *P. citricola* e *P. sojae*, em contato com as células dos cotilédones promoveram a indução de resposta de defesa, produzindo a gliceolina.

O elicitor hepta- β glucosídeo é o heptassacarídeo mais potente pra induzir a produção de fitoalexinas, sendo encontrado na parede celular de *P. sojae*, possui sítios específicos de ligação nas membranas celulares da soja, sendo o principal uma subunidade de 75 kDa (SIMÕES, 2004). O resultado significativo para o tratamento com *P. sojae* concentrado sugerem a presença desse β -glucano no filtrado.

Apesar de não ser específica para a planta da soja, *P. citricola* obteve resultados significativos quanto à indução de gliceolina, não diferindo dos valores de indução encontrados para *P. sojae*. Este patógeno já foi descrito atacando várias famílias diferentes de plantas, devido a este fato foi reclassificada como sendo *P. plurivora* (JUNG, 2009). Suas proteínas extracelulares devem ser de composição variada, ou as plantas que ataca possuem sítios de ligação de proteínas elicitoras bem parecidos para conseguir infectar uma gama tão grande de hospedeiros.

O meio cenoura líquido também apresentou leve indução de resposta nos cotilédones. Como forma de proteção não enzimática a planta possui em seu interior moléculas antioxidantes, dentre elas o ácido ascórbico (vitamina C), glutatona e carotenóides, é possível que a alta concentração de β -caroteno presente no meio cenoura tenha induzido a planta a expressar resultados (MELLO, 2009).

Os demais tratamentos não produziram resultados significativos após as 20 horas de inoculação. Possivelmente, as concentrações em ppm foram pouco significativas para a indução de uma resposta por parte da planta.

6 CONCLUSÃO

A indução de gliceolina em cotilédones de soja mostrou-se significativa para os filtrados puros de *P. citricola* e *P. sojae*.

São necessários mais estudos nessa área, para descobrir e detalhar quimicamente as moléculas de capacidade elicitora presentes no meio de cultura após o cultivo destes patógenos em meio líquido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDANUR, A.; SANTOS, A. F. dos; TRATCH, R. Crescimento Micelial e Esporulação de Isolados de *Phytophthora* sp. Patogênicos à Acácia - negra. **Bol. Pesq. FI**. Colombo, n. 47, p. 33-42, 2003.

ALBRECHT, L. P.; ÁVILA, M. R. Manejo de Glyphosate em Soja RR e a Qualidade das Sementes. Informativo Abrates, v. 20, n. 1,2, p. 45-54, 2010.

ALLIPRANDINI, L. F.; KUREK, A. J.; KRENSKI, A. Extensão de recomendação da cultivar Nk412113 para o sul do Brasil, sul do mato grosso do sul e vale do Paranapanema/SP. Resumos: **XXV Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, 2003.

BARBOSA, M. Z. ASSUMPCÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 7-16, 2001.

BERNARDES, F. de S. **Rizobactérias na Indução de Resistência Sistêmica em Cultivos Hidropônicos**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2006.

BRAZ, S. C. de M.; MOTTA, C. M. de S.; MASSA, D. M. de L.; NEVES, R. P.; MAGALHÃES, O. M. C. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na coleção de culturas University Recife Mycology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 63-66, 2009.

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F. E.; CRIPPA, L. B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R. T. Avaliação in vitro de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos em flores. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 117-122, 2011.

CARVALHO, T. C. DE; GRZYBOWSKI, C. R. DE S.; OHLSON, O. DE C.; PANOBIANCO, M. Comparação da qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e de sua derivada transgênica. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 164 - 170, 2012.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Primeiro levantamento, Brasília. v. 1, p. 1-67, 2013.

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; MORAES, M. R. A. de. Podridão radicular de fitóftora em soja. **EMBRAPA**, ISSN 1518-6512, 2007.

COSTAMILAN, L. M.; CLEBSCH, C. C.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; GODOY, C. V. ; DORRANCE, A. E. Pathogenic diversity of *P. sojae* pathotypes from Brazil. **Eur J Plant Pathol**, 2012.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja, Região Central do Brasil. **Sistemas de Produção 12**. ISSN 1677-8499, 2008.

EMBRAPA. Viabilidade econômica da cultura da soja na safra 2013/2014, em Mato Grosso do Sul. **Comunicado Técnico** 187, junho 2013.

FALEIRO, F.G., LUZ, E.D.M.N., CERQUEIRA, A.O., ROCHA, C.S.S., DANTAS NETO, A., FLORES, A.B., BAHIA, R.C.S. & FALEIRO, A.S.G. Caracterização e diversidade genética de isolados de *Phytophthora* spp. do cacaueiro com base em marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 3, p. 303-306, 2004.

GOMES, E. C. de S.; PEREZ, J. O.; BARBOSA, J. Resistência induzida como componente de manejo de doenças da videira. **Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 2, p. 114-120, 2009.

GOUVEA, A.; ZANOTTI, J.; LUCKMANN, D.; PIZZATTO, M.; MAZARO, S. M.; POSSENTI, J. C. Efeito de extratos vegetais em soja sob condições de laboratório e campo. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.6, n.2, p. 70-78, 2011.

HONG, C.X.; GALLEGLY, M.E.; BROWNE, G.T.; BHAT R.G.; RICHARDSON, P.A.; KONG, P. The avocado subgroup of *P. citricola* constitutes a distinct species, *Phytophthora menzei* sp. nov. **Mycologia**, v. 101, n. 6, p. 833–840, 2009.

ICONE - Instituto de Estudo do Comércio e Negociações Internacionais. **Análise Estratégica para Produção de Soja Responsável no Brasil e na Argentina**. 2011.

JUNG, T.; BURGESS, T. I. Re-evaluation of *P. citricola* isolates from multiple woody host in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. **Persoonia**, v. 22, p. 95-110, 2009.

LOPES, S. M. F. **Análise de parâmetros bioquímicos em clones de castanheiro inoculados com *Phytophthora cinnamomi***. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia e Geologia) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2007.

MAFACIOLI, R.; SANTOS, A. F. dos; TESSMANN, D. J.; VIDA, J. B. Etiologia e Manejo das Doenças da Pupunheira no Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 59-66, 2009.

MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A. de; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 1824 a 1829, 2008.

MEDEIROS, C. A. B.; STRASSBURGER, A. S.; GOMES, C B.; WOLFF, L. F. Controle alternativo de requeima (*Phytophthora infestans*) em batata cultivada em sistema de base ecológica. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. S4821-S4825, 2008.

MELLO, R. de. **Caracterização dos componentes extracelulares produzidas em culturas de células de *Rubus fruticosus* (amora-preta) durante resposta de hipersensibilidade**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MOREIRA, G. C.; SPERGER, T.; SPERGER, A. S.; PALAGI, C. A. Influência da lignina na germinação de sementes de soja. **Cultivando o Saber: Cascavel**, v.5, n.2, p. 175-182, 2012.

MORAES, W.B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pes. Agropec. Bras**, v. 27, S/N, p. 175-190, 1992.

MRÁZKOVÁ M., ČERNÝ K., TOMŠOVSKÝ M., STRNADOVÁ V. *Phytophthora plurivora* T. Jung & T. I. Burgess and other *Phytophthora* species causing important diseases of ericaceous plants in the Czech Republic. **Plant Protect. Sci.**, v. 47, p. 13–19, 2011.

MUNIZ, M.F.S., QUEIROZ, F.M. & MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no Estado de Alagoas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 201-204, 2004.

NAZARENO, N. R. X. de; BOSCHETTO, N.; PINTO, J. A. S. Sobrevivência em Campo de *Phytophthora infestans* em Hastes de Batata no Paraná, Brasil. **Fitopatol. bras**, v. 29, n. 5, 2004.

NELSON, S. C. Late Blight of Tomato (*Phytophthora infestans*). **Plant Disease**, v. 40, 2008.

RIZZARDI. M. A; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT JR, A. A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 957- 965, 2003.

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E. & COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492- 499, 2006.

ROSA, D. D.; MARQUE, J. M. de; FENILLE, R. C.; SOUZA, N. L. de; KURAMAE, E. E. Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian do Estado de São Paulo baseada na sequência de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 429-434, 2003.

SANTOS, A. F. dos & LUZ, E.D.M.N. Distribuição de *Phytophthora nicotianae* e *P. boehmeriae* nas plantações brasileiras de acácia-negra. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p.398-400, 2006.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento/ DERAL - Departamento de Economia Rural. **Soja – Análise da Conjuntura Agropecuária**, Outubro de 2012.

SIKORA, K., VERSTAPPEN, E., MENDES, O., SCHOEN, C., RISTAINO, J., BONANTS, P. A universal microarray detection method for identification of multiple *Phytophthora* spp. using padlock probes. **Phyto- pathology**, v. 102, p. 635-645. 2012.

SIMÕES, K. **Caracterização do Elicificador do Fundo Mucor ramosissimus e Estudo da Supressão de Sua Atividade Indutora de Soja por Fragmentos de Polissacarídeos Pécticos**. 101 f. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SILVA, R. A. de; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. Defesa de Plantas contra o Ataque de Fitopatógenos. **Embrapa, Documentos 250**, 2008.

SILVA, K. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; BOMFIM, M. P.; SILVA, D. S.; JOSÉ, A. R. S.; BENETT, C. G. S. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. Ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SILVEIRA, J. V. F.; RESENDE, L. M. Estratégias de mercado no agronegócio paranaense: soja convencional vs. transgênica. **Produção**, v. 20, n. 1, p. 54-65, 2010.

SORIANO, W. T. **Avaliação de Métodos Alternativos de *Phytophthora* sp. em laranja pêra e limão cravo**. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção e Proteção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2011.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KUHN, O. J. Indução de Fitoalexinas em Soja e Sorgo Por Preparações de *Saccharomyces Boulardii*. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.1, p.91-98, 2010.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**. v. 10, n. 1, p 18-46. 2011.

TAVARES, G. M.; LARANJEIRA, D.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, T. R.; PIROVANI, C. P.; RESENDE, M. L. V. de; JÚNIOR, P. M. R. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesp. agropec. bras.** v. 44, n. 11, p. 1416-1423, 2009.

TERCE-LAFORGUE, T.; HUET, J-C.; PEMOLLET, J-C. Biosynthesis and Secretion of Cryptogein, a Protein Elicitor Secreted by *Phytophthora cryptogea*. **Plant Physiol**, v. 98, p. 936-941, 1992

TOCAFUNDO, F. **Avaliação de Isolados de *Trichoderma* spp. no Controle de *Phytophthora palmivora* em mamoeiro**. 66f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2008.

VENTUROSIO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

YAMADA, T. Resistência de plantas às pragas e doenças: pode ser afetada pelo manejo da cultura?. **Informações Agronômicas**, n. 108, 2004.

ZORZETE, P. **Fungos, Micotoxinas e Fitoalexina em Variedades de Amendoim do Plantio ao Armazenamento**. 188 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.